

日本国特許庁 30.07.99

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JP99/4128

REC'D 17 SEP 1999

WIPCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1998年 9月18日

出願番号

Application Number:

平成10年特許願第264367号

出願人

Applicant(s):

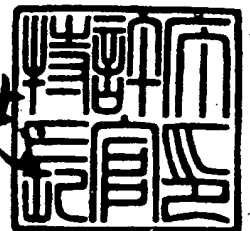
協和メデックス株式会社

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 8月19日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

山田 健太郎



出証番号 出証特平11-3058059

【書類名】 特許願
 【整理番号】 H10-148MK5
 【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特
 許出願
 【提出日】 平成10年 9月18日

【あて先】 特許庁長官殿
 【国際特許分類】 C12Q 1/60
 【発明の名称】 各種リポ蛋白中のコレステロールの分別定量方法および
 定量用試薬

【請求項の数】 14

【発明者】

【住所又は居所】 熊本県熊本市長嶺東二丁目39-13

【氏名】 杉内 博幸

【特許出願人】

【識別番号】 000162478

【氏名又は名称】 協和メデックス株式会社

【代表者】 岡 徹夫

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008408

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 各種リポ蛋白中のコレステロールの分別定量方法および定量用試薬

【特許請求の範囲】

【請求項1】 生体試料中の各種リポ蛋白中のコレステロールを分別定量する方法であって、

- a) 該試料、
- b) コレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼおよび
- c) 高密度リポ蛋白（以下、HDLという）中のコレステロールのみにb)記載の酵素を作用させる試薬を含む緩衝液中で、第1のコレステロールの反応を行い、該反応液中に発生する過酸化水素または還元型補酵素を測定することによりHDL中のコレステロール濃度を定量し、該反応が終了した反応液に、
- d) 低密度リポ蛋白（以下、LDLという）中のコレステロールにb)記載の酵素を作用させる試薬を添加して、第2のコレステロールの反応を行い、該反応液中に発生する過酸化水素または還元型補酵素を測定することによりLDL中のコレステロール濃度を定量することを特徴とする、HDL中のコレステロールおよびLDL中のコレステロールの分別定量方法。

【請求項2】 生体試料中の各種リポ蛋白中のコレステロールを分別定量する方法であって、

- a) 該試料、
- b) コレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼおよび
- c) 高密度リポ蛋白（以下、HDLという）中のコレステロールのみにb)記載の酵素を作用させる試薬を含む緩衝液中で、第1のコレステロールの反応を行い、該反応液中に発生する過酸化水素または還元型補酵素を測定することによりHDL中のコレステロール濃度を定量し、該反応が終了した反応液に、
- d) コレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼおよび

e) 低密度リポ蛋白(以下、LDLという)中のコレステロールにd)記載の酵素を作用させる試薬を添加して、第2のコレステロールの反応を行い、該反応液中に発生する過酸化水素または還元型補酵素を測定することによりLDL中のコレステロール濃度を定量することを特徴とする、HDL中のコレステロールおよびLDL中のコレステロールの分別定量方法。

【請求項3】 生体試料中の各種リポ蛋白中のコレステロールを分別定量する方法であって、

- a) 該試料、
- b) コレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼおよび
- c) HDL中のコレステロールのみにb)記載の酵素を作用させる試薬を含む緩衝液中で、第1のコレステロールの反応を行い、該反応液中に発生する過酸化水素または還元型補酵素を測定することによりHDL中のコレステロール濃度を定量し、該反応が終了した反応液に、
- d) LDL、超低密度リポ蛋白(以下、VLDLという)およびカイロミクロン(以下、CMという)(以下、LDL、VLDLおよびCMをHDL以外のリポ蛋白という)にb)記載の酵素を作用させる試薬を添加して、第2のコレステロールの反応を行い、発生する過酸化水素または還元型補酵素を測定することによりHDL以外のリポ蛋白中のコレステロール濃度を定量することを特徴とする、HDL中およびHDL以外のリポ蛋白中のコレステロールまたは総コレステロールの分別定量方法。

【請求項4】 生体試料中の各種リポ蛋白中のコレステロールを分別定量する方法であって、

- a) 該試料、
- b) コレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼおよび
- c) HDL中のコレステロールのみにb)記載の酵素を作用させる試薬を含む緩衝液中で、第1のコレステロールの反応を行い、該反応液中に発生する過酸化水素または還元型補酵素を測定することによりHDL中のコレステロール濃度を

定量し、該反応が終了した反応液に、

d) コレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼおよび

e) LDL、超低密度リポ蛋白（以下、VLDLという）およびカイロミクロン（以下、CMという）（以下、LDL、VLDLおよびCMをHDL以外のリポ蛋白という）にd)記載の酵素を作用させる試薬を添加して、第2のコレステロールの反応を行い、発生する過酸化水素または還元型補酵素を測定することによりHDL以外のリポ蛋白中のコレステロール濃度を定量することを特徴とする、HDL中およびHDL以外のリポ蛋白中のコレステロールまたは総コレステロールの分別定量方法。

【請求項5】 HDL中のコレステロールのみにコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させる試薬が、HDL以外のリポ蛋白を凝集させる試薬である請求項1～4のいずれかに記載の定量方法。

【請求項6】 HDL以外のリポ蛋白を凝集させる試薬がさらに凝集したりリポ蛋白を溶解しない非イオン性界面活性剤を含有する請求項5記載の定量方法。

【請求項7】 HDL以外のリポ蛋白を凝集させる試薬がヘパリンまたはその塩、リンタングステン酸またはその塩、デキストラン硫酸またはその塩、ポリエチレングリコール、硫酸化シクロデキストリンまたはその塩、硫酸化オリゴ糖またはその塩、もしくはこれらの混合物、および2価の金属塩からなる試薬である請求項5または6記載の定量方法。

【請求項8】 コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼおよびコレステロールデヒドロゲナーゼからなる群より選ばれる酵素が化学修飾された酵素である請求項1～7のいずれかに記載の定量方法。

【請求項9】 LDL中のコレステロールにコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させる試薬が、非イオン系で親水性・親油性バランス（以下、HLBという）が9～20の界面活性剤を含む試薬である請求項1、2、5、6、7および8のいずれかに記載の定量方法。

【請求項10】 HDL以外のリポ蛋白中のコレステロールにコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させる試薬が、HDL以外のリポ蛋白を溶解する界面活性剤を含む試薬である請求項3～8のいずれかに記載の定量方法。

【請求項11】 第一試薬に高密度リポ蛋白以外のリポ蛋白の凝集剤、コレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールエステラーゼとコレステロールデヒドロゲナーゼおよび緩衝剤を含有する試薬および第二試薬に非イオン性でHLBが9～20の界面活性剤を含有する試薬からなる、HDL中のコレステロールとLDL中のコレステロールとを分別定量するための試薬キット。

【請求項12】 第二試薬が、さらにコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールエステラーゼとコレステロールデヒドロゲナーゼを含有する請求項11記載の試薬キット。

【請求項13】 第一試薬に高密度リポ蛋白以外のリポ蛋白の凝集剤、コレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールエステラーゼとコレステロールデヒドロゲナーゼおよび緩衝剤を含有する試薬および第二試薬にHDL以外のリポ蛋白を溶解する界面活性剤を含有する試薬からなるHDL中のコレステロールとHDL以外のリポ蛋白中のコレステロールまたはHDL中のコレステロールと総コレステロールとを分別定量するための試薬キット。

【請求項14】 第二試薬が、さらにコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールエステラーゼとコレステロールデヒドロゲナーゼを含有する請求項13記載の試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、臨床診断の分野において重要な高密度リポ蛋白（HDL）中のコレステロールおよびHDL以外の特定のリポ蛋白中のコレステロールの同時定量方法およびそれに用いる試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】

高密度リポ蛋白（HDL）は動脈壁のコレステロールを除去し肝臓へ運ぶ働きがあるため、通称善玉と呼ばれており、また低密度リポ蛋白（LDL）は動脈壁などの末梢組織にコレステロールを運搬する働きがあるため通称悪玉と呼ばれている。臨床検査分野においてHDL中のコレステロール濃度、LDL中のコレステロール濃度および総コレステロール濃度（HDL、LDL、VLDLおよびCM中のコレステロールの総量）は、動脈硬化症等の脂質に関する疾病の総合判断の指標として利用されている。

【0003】

これらの測定にはそれぞれに特異性がある別々の試薬で独立して測定されており、自動分析機も別々に測定するように設定されている。現在、HDL中のコレステロール、LDL中のコレステロール、総コレステロールはそれぞれ別々の専用試薬を用いて独立に測定されているが、同一検体から複数の項目を測定する簡便で経済的な方法は知られていない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、同一検体のHDL中のコレステロールおよびLDL等のHDL以外のリポ蛋白中のコレステロールまたは総コレステロールを連続して分別定量する方法および該方法において使用する試薬を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明は、以下の（1）から（14）に関する。

（1） 生体試料中の各種リポ蛋白中のコレステロールを分別定量する方法であって、

a) 該試料、

b) コレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼおよび

c) 高密度リポ蛋白（以下、HDLという）中のコレステロールのみにb) 記

載の酵素を作用させる試薬を含む緩衝液中で、第1のコレステロールの反応を行い、該反応液中に発生する過酸化水素または還元型補酵素を測定することによりHDL中のコレステロール濃度を定量し、該反応が終了した反応液に、

d) 低密度リポ蛋白（以下、LDLという）中のコレステロールにb)記載の酵素を作用させる試薬を添加して、第2のコレステロールの反応を行い、該反応液中に発生する過酸化水素または還元型補酵素を測定することによりLDL中のコレステロール濃度を定量することを特徴とする、HDL中のコレステロールおよびLDL中のコレステロールの分別定量方法。

【0006】

(2) 生体試料中の各種リポ蛋白中のコレステロールを分別定量する方法であって、

a) 該試料、

b) コレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼおよび

c) 高密度リポ蛋白（以下、HDLという）中のコレステロールのみにb)記載の酵素を作用させる試薬を含む緩衝液中で、第1のコレステロールの反応を行い、該反応液中に発生する過酸化水素または還元型補酵素を測定することによりHDL中のコレステロール濃度を定量し、該反応が終了した反応液に、

d) コレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼおよび

e) 低密度リポ蛋白（以下、LDLという）中のコレステロールにd)記載の酵素を作用させる試薬を添加して、第2のコレステロールの反応を行い、該反応液中に発生する過酸化水素または還元型補酵素を測定することによりLDL中のコレステロール濃度を定量することを特徴とする、HDL中のコレステロールおよびLDL中のコレステロールの分別定量方法。

【0007】

(3) 生体試料中の各種リポ蛋白中のコレステロールを分別定量する方法であって、

a) 該試料、

b) コレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼおよび

c) HDL中のコレステロールのみにb)記載の酵素を作用させる試薬を含む緩衝液中で、第1のコレステロールの反応を行い、該反応液中に発生する過酸化水素または還元型補酵素を測定することによりHDL中のコレステロール濃度を定量し、該反応が終了した反応液に、

d) LDL、超低密度リポ蛋白（以下、VLDLという）およびカイロミクロン（以下、CMという）（以下、LDL、VLDLおよびCMをHDL以外のリポ蛋白という）にb)記載の酵素を作用させる試薬を添加して、第2のコレステロールの反応を行い、発生する過酸化水素または還元型補酵素を測定することによりHDL以外のリポ蛋白中のコレステロール濃度を定量することを特徴とする、HDL中およびHDL以外のリポ蛋白中のコレステロールまたは総コレステロールの分別定量方法。

【0008】

(4) 生体試料中の各種リポ蛋白中のコレステロールを分別定量する方法であって、

a) 該試料、

b) コレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼおよび

c) HDL中のコレステロールのみにb)記載の酵素を作用させる試薬を含む緩衝液中で、第1のコレステロールの反応を行い、該反応液中に発生する過酸化水素または還元型補酵素を測定することによりHDL中のコレステロール濃度を定量し、該反応が終了した反応液に、

d) コレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼおよび

e) LDL、超低密度リポ蛋白（以下、VLDLという）およびカイロミクロン（以下、CMという）（以下、LDL、VLDLおよびCMをHDL以外のリポ蛋白という）にd)記載の酵素を作用させる試薬を添加して、第2のコレステロールの反応を行い、発生する過酸化水素または還元型補酵素を測定すること

によりHDL以外のリポ蛋白中のコレステロール濃度を定量することを特徴とする、HDL中およびHDL以外のリポ蛋白中のコレステロールまたは総コレステロールの分別定量方法。

【0009】

(5) HDL中のコレステロールのみにコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させる試薬が、HDL以外のリポ蛋白を凝集させる試薬である(1)～(4)いずれかに記載の定量方法。

(6) HDL以外のリポ蛋白を凝集させる試薬がさらに凝集したリポ蛋白を溶解しない非イオン性界面活性剤を含有する(5)記載の定量方法。

【0010】

(7) HDL以外のリポ蛋白を凝集させる試薬がヘパリンまたはその塩、リンタングステン酸またはその塩、デキストラン硫酸またはその塩、ポリエチレングリコール、硫酸化シクロデキストリンまたはその塩、硫酸化オリゴ糖またはその塩、もしくはこれらの混合物、および2価の金属塩からなる試薬である(5)または(6)記載の定量方法。

【0011】

(8) コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼおよびコレステロールデヒドロゲナーゼからなる群より選ばれる酵素が化学修飾された酵素である(1)～(7)のいずれかに記載の定量方法。

(9) LDL中のコレステロールにコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させる試薬が、非イオン系で親水性・親油性バランス(以下、HLBという)が9～20の界面活性剤を含む試薬である(1)、(2)、(5)、(6)、(7)および(8)のいずれかに記載の定量方法。

【0012】

(10) HDL以外のリポ蛋白中のコレステロールにコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させる試薬が、HDL以外のリポ蛋白を溶解する界面活性剤を含む試薬である

(3) ~ (8) のいずれかに記載の定量方法。

【0013】

(11) 第一試薬に高密度リポ蛋白以外のリポ蛋白の凝集剤、コレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールエステラーゼとコレステロールデヒドロゲナーゼおよび緩衝剤を含有する試薬および第二試薬に非イオン性でHLBが9~20の界面活性剤を含有する試薬からなる、HDL中のコレステロールとLDL中のコレステロールとを分別定量するための試薬キット。

【0014】

(12) 第二試薬が、さらにコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールエステラーゼとコレステロールデヒドロゲナーゼを含有する(11)記載の試薬キット。

(13) 第一試薬に高密度リポ蛋白以外のリポ蛋白の凝集剤、コレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールエステラーゼとコレステロールデヒドロゲナーゼおよび緩衝剤を含有する試薬および第二試薬にHDL以外のリポ蛋白を溶解する界面活性剤を含有する試薬からなるHDL中のコレステロールとHDL以外のリポ蛋白中のコレステロールまたはHDL中のコレステロールと総コレステロールとを分別定量するための試薬キット。

【0015】

(14) 第二試薬が、さらにコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールエステラーゼとコレステロールデヒドロゲナーゼを含有する(11)記載の試薬キット。

以下、本発明を詳細に説明する。

【0016】

【発明の実施の形態】

本発明では、生体試料中のHDL中のコレステロールを測定し、HDL中のコレステロール濃度を測定後、該測定反応液に特定の試薬を添加してLDL中のコレステロールまたはHDL以外のリポ蛋白中のコレステロールを定量する。

【0017】

試料中のHDLコレステロールの反応は、試料にHDL中のコレステロールのみにコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させる試薬を含む緩衝液の存在下で行う。該試薬としては、例えばHDL以外のリポ蛋白を凝集させる試薬、およびHDL以外のリポ蛋白に対する抗体があげられる。HDL以外のリポ蛋白を凝集させる試薬には凝集したリポ蛋白を溶解しない非イオン性界面活性剤を含有させるのが好ましい。

【0018】

リポ蛋白を凝集させる試薬には凝集剤および2価の金属塩が含まれる。凝集剤としては、ヘパリンまたはその塩、リンタングステン酸またはその塩、デキストラン硫酸またはその塩、ポリエチレングリコール、硫酸化シクロデキストリンまたはその塩、硫酸化オリゴ糖またはその塩、もしくはこれらの混合物などがあげられ、シクロデキストリンとしては、 α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリン、 γ -シクロデキストリンなどがあげられ、オリゴ糖としては、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオースなどがあげられ、塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩、アンモニウム塩、マグネシウム塩などがあげられる。2価の金属塩としては、マグネシウム塩、カルシウム塩、マンガン塩、ニッケル塩などがあげられる。

【0019】

凝集剤としては、0.02~10mMの分子量5000~20000のヘパリンまたはその塩、0.1~10mMの分子量4000~8000のリンタングステン酸またはその塩、0.01~5mMの分子量10000~500000のデキストラン硫酸またはその塩、0.1~20mMの分子量1000~10000のデキストラン硫酸またはその塩、0.3~100mMの分子量4000~25000のポリエチレングリコール(PEG)、0.1~50mMの分子量1000~3000の硫酸化シクロデキストリンまたはその塩、0.1~50mMの分子量400~3000の硫酸化オリゴ糖またはその塩、もしくはそれらの混合物などが好ましく用いられる。さらに好ましくは、0.03~1mMの分子量14

000~16000のヘパリンまたはその塩、0.1~3 mMの分子量5000~7000のリンタングステン酸またはその塩、0.01~5 mMの分子量150000~250000のデキストラン硫酸またはその塩、0.1~10 mMの分子量1000~5000のデキストラン硫酸またはその塩、1.0~50 mMの分子量5000~22000のPEG、0.1~10 mMの分子量1000~2000の硫酸化シクロデキストリンまたはその塩、0.1~10 mMの分子量400~2000の硫酸化オリゴ糖またはその塩、もしくはそれらの混合物などが用いられる。

【0020】

2価の金属塩としては、0.1~50 mMのマグネシウム塩、カルシウム塩、マンガン塩、ニッケル塩、コバルト塩などがあげられ、好ましくは、0.1~50 mMのマグネシウム塩が用いられる。

HDL中のコレステロールを測定する場合に用いられるリポ蛋白を溶解しない非イオン性界面活性剤としては、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルアリルエーテル、ポリオキシエチレンーポリオキシプロピレン縮合物、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩、アルキルベンゼンスルホン酸塩等があげられる。これらのうち、ポリオキシエチレンアルキルエーテルとしては、ポリオキシエチレンエーテル〔エマルゲン220（花王社製）等〕が、ポリオキシエチレンアルキルアリルエーテルとしては、市販品としてエマルゲンB66等が、ポリオキシエチレンーポリオキシプロピレン縮合物としては、市販品としてプルロニックF88（旭電化社製）等が、ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸ナトリウム〔市販品としては、エマール20C（花王社製）等〕が、アルキルベンゼンスルホン酸塩としては、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムが好ましい。

これらの界面活性剤は単独または組み合わせて使用することができる。使用濃度は特に限定されないが、0.01~10%が好ましく、0.1~5%が特に好ましい。

【0021】

HDL以外のリポ蛋白に対する抗体としては、抗アポリポ蛋白B抗体、抗アポ

リポ蛋白C抗体、抗アポリポ蛋白E抗体、抗 β リポ蛋白抗体等があげられ、単独もしくは組み合わせて用いる。抗体としては、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよい。またこれら抗体は、酵素的または化学的に分解、修飾されたものでもよい。

【0022】

④ HDL中のコレステロールが反応した後の反応液に存在するLDL中のコレステロールにコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させる試薬としては、例えば非イオン系で親水性・親油性バランス（以下、HLBという）が9～20の界面活性剤があげられる。

【0023】

LDL中のコレステロールを特異的に測定する場合に使用される界面活性剤としては、非イオン系でHLBが9～20の界面活性剤であり、市販品として例えば、エマルゲンL-40、エマルゲンL-70等のポリオキシエチレンアルキルアリルエーテル類、プルロニックL-121等のポリオキシプロピレン重合体等があげられる。これらの界面活性剤は単独または組み合わせて使用することができる。使用濃度は特に限定されないが、0.01～10%が好ましく、0.1～5%が特に好ましい。

【0024】

④ HDL中のコレステロールが反応した後の反応液に存在するHDL以外のリポ蛋白中のコレステロールにコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させる試薬としては、HDL以外のリポ蛋白を溶解する界面活性剤があげられる。

【0025】

HDL以外のリポ蛋白中のコレステロールを測定する場合に使用される界面活性剤としては、LDL、VLDLおよびCMのリポ蛋白を溶解する非イオン性界面活性剤である。具体的界面活性剤としては、市販品としてトリトンX-100などのノニオン界面活性剤、エマルゲン106、エマルゲン108、エマルゲン709等のポリオキシエチレンアルキルエーテル類等があげられる。これらの界

面活性剤は単独または組み合わせて使用することができる。使用濃度は特に限定されないが、0.01～10%が好ましく、0.1～5%が特に好ましい。

【0026】

④ 緩衝液としては、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、グッドの緩衝剤、リン酸緩衝剤、ホウ酸緩衝剤等があげられる。例えば、N-（2-アセタミド）-2-アミノエタンスルホン酸、N-（2-アセタミド）イミノ二酢酸等のグリシン誘導体、N，N-ビス（2-ヒドロキシエチル）-2-アミノエタンスルホン酸、ビス（2-ヒドロキシエチル）イミノトリス（ヒドロキシメチル）メタン、3-〔N，N-ビス（2-ヒドロキシエチル）アミノ〕-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸等の2-ヒドロキシエチルアミン誘導体、3-〔N-トリス（ヒドロキシメチル）メチルアミン〕-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸、N-トリス（ヒドロキシメチル）-2-アミノエタンスルホン酸等のトリス（ヒドロキシメチル）アミン誘導体、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、およびモルホリノエタンスルホン酸等があげられる。pHは5～10、好ましくは6～9である。緩衝剤の使用濃度は、5～500mM、好ましくは20～200mMである。

【0027】

酵素としては、通常市販されている、コレステロールエステルを加水分解する能力を有する微生物または動物由来のコレステロールエステラーゼやリボプロテインリパーゼ、コレステロールを酸化して過酸化水素を生成する微生物由来のコレステロールオキシダーゼ、微生物または動物由来のコレステロールデヒドロゲナーゼなどがあげられるが、これら酵素の特異性、安定性をさらにあげるためにポリエチレングリコールを主成分とする基、水溶性のオリゴ糖残基、スルホプロピル基などで上記の酵素を化学的に修飾したものも用いられる。また、遺伝子操作により得られる酵素も用いられる。

【0028】

酵素を修飾するための試薬（化学修飾剤）としては、例えば、ポリエチレングリコールにアミノ基と結合可能な基を結合させた化合物（ポリエチレングリコールにN-ヒドロキシサクシンイミド基等のアミノ基と結合可能な基を結合させた

サンブライト VFM4101 [日本油脂(株)製]等)、ポリアルキレングリコール構造および酸無水物構造を有するサンブライトAKMシリーズ、同ADMシリーズ、同ACMシリーズ [いずれも日本油脂(株)製: 化学工学論文集、第20巻、第3号、459頁、1994年]、ポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールの共重合体にアミノ基と結合可能な基を結合させた化合物、ポリエチレングリコールモノメタクリルモノメチルエーテルと無水マレイン酸の共重合体等があげられる。また、ポリウレタンの化学修飾剤であるポリウレタンP4000activated (ベーリンガーマンハイム社製 Enzyme modification set能書)、デキストランの化学修飾剤であるデキストランT40, TCT-activated (同)、1, 3-プロパンサルトン等も使用できる。これら化学修飾剤により、酵素を、ポリエチレングリコールを主成分とする基、ポリプロピレングリコールを主成分とする基、ポリプロピレングリコールとポリエチレングリコールの共重合体を有する基、構造に糖類を含む基、スルホプロピル基、ポリウレタン基等で修飾することができる。

【0029】

次に、酵素に上記化学修飾剤を反応させる方法を例示するが、これによって制約されない。まず、酵素をpH8以上のヘプス緩衝液等の緩衝液中に溶解し、0~50℃で例えば0.01~500倍モル量のサンブライトを添加し、5~60分間攪拌する。この反応液をそのままあるいは必要に応じて限外濾過膜により低分子物を除去して用いる。

【0030】

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素およびコレステロール酸化還元酵素の使用量は、0.01~200U/mlが好ましく0.1~100U/mlがより好ましい。本発明では、第2のコレステロール反応に使用するコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼは第1のコレステロール反応に使用したコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを利用することもでき、その場合は、第2のコレステロールの反応に新たに添加する必要がない。また、本発明では、第1のコレステロール反応に使用す

るコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼと第2のコレステロール反応に使用するコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼが異なる起源の酵素であってもよい。第1のコレステロール反応には、化学修飾したコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを用い、第2のコレステロールの反応には化学修飾していないコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを用いることが好ましい。

【0031】

本発明のコレステロール反応は、通常のコレステロールを測定する系を含んでいるため、反応の特異性に影響を及ぼさない範囲で、コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼ等を活性化するためによく使用される界面活性剤あるいはコール酸類も使用可能であり、また、グロブリンなどを可溶化するための種々の塩類を使用することもできる。界面活性剤としては、ノニオン系、アニオン系、カチオン系の界面活性剤が0～1%の範囲で使用される。コール酸類としては、コール酸、デオキシコール酸、タウロコール酸、ケノデオキシコール酸などが0～5%の範囲で使用される。アニオン界面活性剤としては1-ペンタスルホン酸塩、1-ヘキサスルホン酸塩、1-ヘプタスルホン酸塩、1-オクタスルホン酸塩などのアルキルスルホン酸塩があげられ0～5%の範囲で使用される。塩類としては、塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム、塩化カリウム、硫酸カリウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、酢酸マグネシウム、塩化リチウム、硫酸リチウム、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸マグネシウム、硝酸カルシウムなどが0～100 mMの範囲で使用される。

【0032】

コレステロールの反応がコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼにより行われる場合は、過酸化水素が発生する。発生した過酸化水素は、例えばパーオキシダーゼの存在下、4-アミノアンチピリンとフェノール類、4-アミノアンチピリンとトリンダー試薬または高感度の色素源を用いて定量することができる。

【0033】

フェノール類としては、例えばフェノール、4-クロロフェノール、m-クレゾール、3-ヒドロキシ-2, 4, 6-トリヨード安息香酸 (HTIB) 等があげられる。

トリンダー試薬 (同仁化学研究所第19版総合カタログ、1994年) としては、N-スルホプロピルアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン (TOOS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメチルアニリン (MAOS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン (DAOS)、N-エチル-N-スルホプロピル-m-トルイジン (TOPS)、N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン (HDAOS)、N, N-ジメチル-m-トルイジン、N, N-ジスルホプロピル-3, 5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-スルホプロピル-m-アニシジン、N-エチル-N-スルホプロピルアニリン、N-エチル-N-スルホプロピル-3, 5-ジメトキシアニリン、N-スルホプロピル-3, 5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-スルホプロピル-3, 5-ジメチルアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-アニシジン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル) アニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン等のアニリン類あるいはN-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-サクシニルエチレンジアミン (EMSE)、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-アセチルエチレンジアミン等があげられる。

【0034】

高感度の色素源として、特公昭60-33479で示される10-(N-メチルカルバモイル)-3, 7-ビス(ジメチルアミノ)フェノチアジン (MCDP)、特公平4-27839で示されるビス[3-ビス(4-クロロフェニル)メチル-4-ジメチルアミノフェニル]アミン (BCMA)、特開昭62-296で示される色素源等があげられる。

【0035】

これら色素源の濃度としては、 $0.01 \sim 10 \text{ mg/ml}$ が好ましい。

コレステロールの反応が、基質として酸化型補酵素であるNAD(P)存在下に、コレステロールエステラーゼとコレステロールデヒドロゲナーゼにより行われる場合は、還元型補酵素であるNAD(P)Hが発生する。NAD(P)Hは、直接 $300 \sim 500 \text{ nm}$ 、好ましくは $330 \sim 400 \text{ nm}$ 、特に好ましくは約 340 nm の吸光度を測定することにより定量することができる。なお、NAD(P)Hの定量は、ジアホラーゼ、テトラゾリウム塩を添加してホルマザン色素の発色に導き、ホルマザン色素を比色して行うこともできる。

【0036】

HDL中のコレステロールの反応(第1の反応)は、 $10 \sim 50^\circ\text{C}$ 、好ましくは $30 \sim 40^\circ\text{C}$ 、通常 37°C で、 $1 \sim 30$ 分間、好ましくは $2 \sim 10$ 分間行い、LDL中のコレステロールまたはHDL以外のリポ蛋白中のコレステロールの反応(第2の反応)は、 $10 \sim 50^\circ\text{C}$ 、好ましくは $30 \sim 40^\circ\text{C}$ 、通常 37°C で、 $1 \sim 30$ 分間、好ましくは $2 \sim 10$ 分間行う。第2の反応は、第1の反応で反応が実質的に終了した後、LDL中のコレステロールにコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを特異的に作用させる試薬またはHDL以外のリポ蛋白中のコレステロールにコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させる試薬を添加して開始する。第2の反応により発生する過酸化水素または還元型補酵素[NAD(P)H]を定量する試薬は、第1の反応液に使用したものがそのまま使用できるが、必要により新たに添加してもよい。

【0037】

コレステロール濃度は、試料を用いた場合の第1の反応前後の吸光度の差(OD1)、第2の反応前後の吸光度の差(OD2)および各種リポ蛋白中のコレステロール濃度既知の試料を用いた場合の第1の反応前後の吸光度の差(OD1std)、第2の反応前後の吸光度の差(OD2std)を求め以下の計算により算出される。

【0038】

HDL中のコレステロール濃度は、例えば $\text{OD1} \div \text{OD1std} \times (\text{既知のHD})$

L中のコレステロール濃度)の計算により求めることができる。LDLコレステロール濃度は、例えば $OD2 \div OD2_{std} \times$ (既知のLDL中のコレステロール濃度)の計算により求めることができる。また、HDL以外のリポ蛋白中のコレステロール濃度は、例えば $OD2 \div OD2_{std} \times$ (既知のHDL以外のリポ蛋白中のコレステロール濃度)の計算により求めることができる。

【0039】

なお、第1の反応と第2の反応で生成する化合物が同一であり検出方法が同一の場合は、総コレステロール濃度は、 $(OD2 + OD1) \div (OD2_{std} + OD1_{std}) \times$ (既知の総コレステロール濃度)の計算により求めることができる。

本発明のHDL中のコレステロールとLDL中のコレステロールとを分別定量するための試薬キットは、第一試薬と第二試薬のキットからなり、第一試薬は高密度リポ蛋白以外のリポ蛋白の凝集剤、コレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールエステラーゼとコレステロールデヒドロゲナーゼおよび緩衝剤を含む試薬からなり、第二試薬は非イオン性界面活性剤を含有する試薬からなる。

【0040】

また、本発明のHDL中のコレステロールとHDL以外のリポ蛋白中のコレステロールまたは総コレステロールとを分別定量するための試薬キットは、第一試薬と第二試薬のキットからなり、第一試薬に、高密度リポ蛋白以外のリポ蛋白の凝集剤、コレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールエステラーゼとコレステロールデヒドロゲナーゼおよび緩衝剤を含有する試薬からなり、第二試薬はすべてのリポ蛋白を溶解する非イオン性界面活性剤を含有する試薬からなる。

【0041】

第一試薬には、必要に応じて前述のコレステロール測定に用いられる界面活性剤、コール酸類、種々の塩類、パーオキシダーゼ等の酵素、4-アミノアンチピリンおよびトリンダー試薬等の色源体等、NAD(P)等の酸化型補酵素を含有することができる。

また、第二試薬には、必要に応じて、第一試薬と同一または異なる起源のコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼ、前述のコレステロール測定に用いられる界面活性剤、コール酸類、種々の塩類、パーオキシダーゼ等の酵素、4-アミノアンチピリンおよびトリンダー試薬等の色源体等、NAD(P)等の酸化型補酵素を含有することができる。

【0042】

第二試薬に、コレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを使用する場合は、第一試薬に使用するコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼは、前述の化学修飾された酵素とし、第二試薬に用いるコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼは、化学修飾されていない酵素を用いるのが好ましい。

以下に実施例を示す。

【実施例】

【0043】

実施例1 (HDL中のコレステロールとLDL中のコレステロールの測定)

試薬1 (pH=7)

モルホリノエタンスルホン酸	20 mM
デキストラン硫酸	0.23 mg/ml
硫酸マグネシウム	1.5 mg/ml
HDAOS (同仁化学社、カタログ)	0.23 mg/ml
4-アミノアンチピリン	0.13 mg/ml
ポリエチレングリコール修飾コレステロールエステラーゼ	0.25 U/ml
ポリエチレングリコール修飾コレステロールオキシダーゼ	1.65 U/ml
パーオキシダーゼ	12.5 U/ml

【0044】

試薬2 (pH=7)

モルホリノエタンスルホン酸	20 mM
---------------	-------

コレステロールエステラーゼ (リポプロテインリパーゼ)	3 U/ml
コレステロールオキシダーゼ	2 U/ml
1	
プルロニック L-121 (旭電化工業)	0.7
%	
エマルゲン L-40 (花王)	0.
5%	
塩化カルシウム	0.
1 mg/ml	
【0045】	

検体として、健常人30検体を用意し、下記の操作を行い、検体値を求めた。
 試薬1、2、25 mlに検体30 μ lを添加、攪拌し、直後585 nmの吸光度E1を測定した。続いて37℃で5分間反応後同じ吸収波長の吸光度E2を測定した、これにさらに試薬2、0.75 mlを添加、攪拌し直後の吸光度E3を続いて37℃で5分間反応後同じ吸収波長の吸光度E4を測定した。一方、コレステロール既知濃度の血清を同様な操作をして、E1 std、E2 std、E3 stdおよびE4 stdを求めた。

【0046】

HDL中のコレステロール濃度は吸光度から、 $(E2 - E1) \div (E2 \text{ std} - E1 \text{ std}) \times (\text{既知HDL濃度})$ の式により求めた。同様にLDL中のコレステロール濃度も吸光度から、 $(E4 - E3) \div (E4 \text{ std} - E3 \text{ std}) \times (\text{既知LDL濃度})$ の式により求めた。

また、別途これら30検体をそれぞれ単独の測定法のキットであるデタミナーL HDL-C (協和メデックス社製) およびデタミナーLDL-C (協和メデックス社製) を使用して検体中のHDL中のコレステロール濃度、LDL中のコレステロール濃度を測定した。該キットで得られた検体値と本法で得られた検体値の相関係数を計算したところ、HDL中のコレステロールにおいて0.997、LDL中のコレステロールで0.988であった。

【0047】

図1は、本法（図1中、DB HDL-Cと表示）で得られるHDL中のコレステロール濃度と対照方法（L HDL-C方法、図1中、S HDL-Cと表示）で得られるHDL中のコレステロール濃度の相関図を示す。また図2は、本法（図2中、DB LDL-Cと表示）で得られるLDLコレステロール値と対照方法（L LDL-C方法、図2中、S LDL-Cと表示）で得られるLDLコレステロール値の相関図を示す。

【0048】

④実施例2（HDLコレステロールとLDLコレステロールの測定）

試薬1（pH=7）

モルホリノエタンスルホン酸	20 mM
リンタンゲステン酸	7.5 mg/ml
硫酸マグネシウム	1.5 mg/ml
TOOS（同仁化学社、カタログ）	0.5 mg/ml
ポリエチレングリコールアルキルフェニルエーテル	10 mg/ml
4-アミノアンチピリン	0.5 mg/ml
コレステロールエステラーゼ（LPBP、旭化成（株）製）	4 U/ml
コレステロールオキシダーゼ（rCO、荻原酵母（株）製）	2 U/ml
パーオキシダーゼ	10 U/ml

【0049】

試薬2（pH=7）

モルホリノエタンスルホン酸	50 mM
コレステロールエステラーゼ（リポプロテインリパーゼ）	3 U/ml
コレステロールオキシダーゼ	2 U/ml
プルロニックL-121（旭電化工業）	0.7%
エマルゲンL-40（花王）	0.5%
塩化カルシウム	0.1 mg/ml

【0050】

実施例1と同じ検体を用いて実施例1と測定波長を555 nmにした他は同様な操作を行って検体値を求めた。デタミナーL HDL-C（協和メデックス社

製) およびデタミナーLDL-C (協和メデックス社製) のキットで得られた検体値と本法で得られた検体値の相関計数を計算したところ、HDL中のコレステロールでは相関係数0.929、LDL中のコレステロールで0.911であった。

【0051】

④実施例3 (HDLコレステロールと総コレステロールの測定)

試薬1 (pH=7)

モルホリノエタンスルホン酸	2.0 mM	
デキストラン硫酸	0.23 mg/ml	
硫酸マグネシウム	1.5 mg/ml	
HDAOS	0.23 mg/ml	
4-アミノアンチピリン	0.13 mg/ml	
ポリエチレングリコール修飾コレステロールエステラーゼ	0.25 U/ml	
ポリエチレングリコール修飾コレステロールオキシダーゼ	1.65 U/ml	
パーオキシダーゼ	12.5 U/ml	

【0052】

試薬2 (pH=6.75)

モルホリノエタンスルホン酸	3.0 mM
トリトンX-100	1 g/L
コレステロールエステラーゼ	2.4 U/ml
コレステロールオキシダーゼ	6.25 U/ml

【0053】

検体として、前出の健常人30検体を用意し、下記の操作を行い、検体値を求めた。試薬1、2.25 mlに検体30 μ lを添加、攪拌し、直後585 nmの吸光度E1を測定した。続いて37℃で5分間反応後同じ吸収波長の吸光度E2を測定した。これにさらに試薬2、0.75 mlを添加、攪拌し直後の吸光度E3を続いて37℃で5分間反応後同じ吸収波長の吸光度E4を測定した。一方、

コレステロール既知濃度の血清を同様な操作をして、E 1 std、E 2 std、E 3 stdおよびE 4 stdを求めた。

【0054】

HDL中のコレステロール濃度は吸光度から、 $(E 2 - E 1) \div (E 1 \text{ std} - E 2 \text{ std}) \times (\text{既知HDL濃度})$ の式から求めた。同様に総コレステロール濃度は吸光度から、 $(E 4 - E 1) \div (E 4 \text{ std} - E 1 \text{ std}) \times (\text{既知総コレステロール濃度})$ の式により求めた。

また、別途これら30検体をそれぞれ単独の測定法のキットであるデタミナーL HDL-C（協和メデックス社製）およびデタミナーL TC II（協和メデックス社製）を使用して検体中のHDL中のコレステロール、総コレステロールを測定した。該キットで得られた検体値と本法で得られた検体値の相関計数を計算したところ、HDL中のコレステロールで0.992、総コレステロールで0.999であった。

【0055】

図3は、本法（図3中、DB HDL-Cと表示）で得られるHDL中のコレステロール値と対照方法（L HDL-C方法、図3中、S HDL-Cと表示）で得られるHDL中のコレステロール値の相関図を示す。また図4は、本法（図4中、DB-TCと表示）で得られるLDL中のコレステロール値と対照方法（デタミナーL TC II方法、図4中、L TC IIと表示）で得られるLDL中のコレステロール値の相関図を示す。

【0056】

【発明の効果】

本発明により、同一試料中のHDL中のコレステロールおよびHDL以外のリポ蛋白中のコレステロールを同時に測定する方法および該方法に用いる試薬が提供される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本法（図中、DB HDL-Cと表示）で得られるHDLコレステロール値と対照方法（L HDL-C方法、図中、S HDL-Cと表示）で得られるHDLコレステロール値の相関を示す。

【図2】 本法（図中、DB LDL-Cと表示）で得られるLDLコレステロール値と対照方法（L LDL-C方法、図中、S LDL-Cと表示）で得られるLDLコレステロール値の相関を示す。

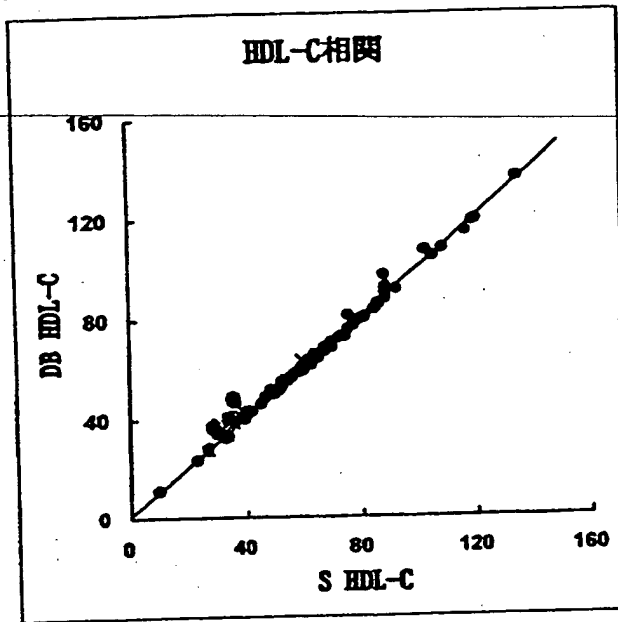
【図3】 本法（図中、DB HDL-Cと表示）で得られるHDLコレステロール値と対照方法（L HDL-C方法、図中、S HDL-Cと表示）で得られるHDLコレステロール値の相関を示す。

【図4】 本法（図中、DB-TCと表示）で得られるLDLコレステロール値と対照方法（デタミナーL TC II方法、図中、L TC IIと表示）で得られるLDLコレステロール値の相関を示す。

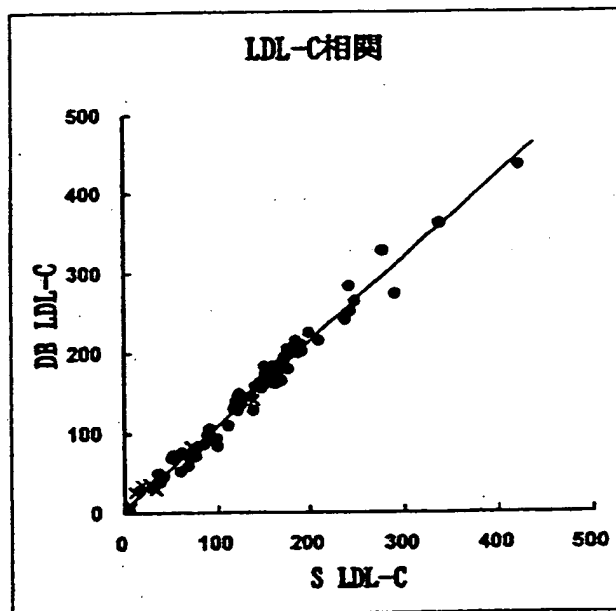
【書類名】

図面

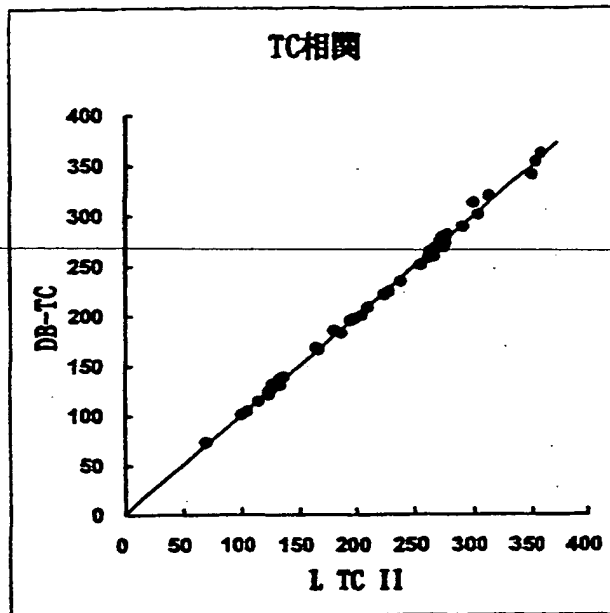
【図 1】



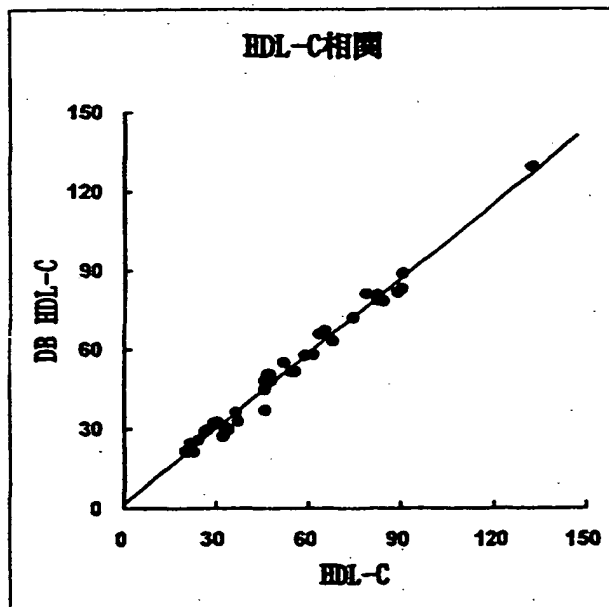
【図 2】



【図3】



【図4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 同一検体中のHDL中のコレステロールおよびその他の特定のリポ蛋白中のコレステロールを連続して分別定量する方法およびそれに使用する試薬を提供すること。

【解決手段】 生体試料中の各種リポ蛋白中のコレステロールを分別定量する方法であって、該試料に高密度リポ蛋白(HDL)中のコレステロールのみに反応させる試薬を含む緩衝液の存在下コレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させ、発生する過酸化水素または還元型補酵素を測定することによりHDL中のコレステロール濃度を定量し、ついで該反応が終了した反応液に低密度リポ蛋白(LDL)中のコレステロールを反応させる試薬を添加してコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼまたはコレステロールデヒドロゲナーゼを作用させ、発生する過酸化水素または還元型補酵素を測定することによりLDL中のコレステロール濃度を定量することを特徴とする、HDLおよびLDL中のコレステロールの分別定量方法および該方法に用いる試薬。

【選択図】 なし

【書類名】
【訂正書類】

職権訂正データ
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

申請人

【識別番号】

000162478

【住所又は居所】

東京都中央区入船二丁目1番1号

【氏名又は名称】

協和メデックス株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000162478]

1. 変更年月日 1994年 9月13日
[変更理由] 住所変更
住 所 東京都中央区入船二丁目1番1号
氏 名 協和メデックス株式会社